



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Título del trabajo:

Translocación de polímeros: estudio de interacción
polímero-membrana

English title:

Polymer translocation: study of polymer-
membrane interaction.

Autor/es

Pedro García Gómez

Director/es

Fernando Falo
Alessandro Fiasconaro

Titulación del autor

Grado en Física

FACULTAD DE CIENCIAS
2020

Índice

1. Introducción al problema de la traslocación de polímeros	2
2. Principales modelos de polímeros: Freely-Jointed Chain Model y Worm-like Chain Model	2
2.1. Freely-Jointed Chain Model	2
2.2. Modelo de simulación	4
2.3. Worm-like Chain Model	6
3. Resultados analíticos de la interacción del polímero con la pared	8
3.1. Fuerza polímero-pared para un sistema de malla con el polímero anclado a la pared	8
4. Resultados experimentales de la interacción del polímero con la pared	11
4.1. Freely-Jointed Chain Model	12
4.1.1. Fuerza en el eje perpendicular a la pared	12
4.1.2. Radio de Giro	14
4.1.3. Centro de masas y distancia extremo a extremo en el eje perpendicular a la pared	14
4.2. Worm-like Chain Model	15
4.2.1. Fuerza en el eje perpendicular a la pared	15
4.2.2. Radio de Giro	17
4.2.3. Centro de masas y distancia extremo a extremo en el eje perpendicular a la pared	17
4.3. Interacciones con la pared	18
5. Discusión final y conclusiones	23
Anexos	26
A. Ecuación de Langevin	26
B. Algoritmo de evolución estocástica Gronbech-Jensen	28
C. Polímero anclado a una distancia h de la pared	29
D. Fit de la fuerza en el eje perpendicular a la pared para el modelo WLC	31
E. Centro de masas y distancia extremo a extremo en el eje perpendicular a la pared para el modelo WLC	32
F. Fits del número de interacciones de cada monómero	33
G. Código en C empleado	36

1. Introducción al problema de la traslocación de polímeros

La traslocación es un proceso de dinámica molecular en el cual un polímero (molécula con forma de cadena, compuesta por multitud de partículas idénticas) cruza una membrana de un lado a otro. Es un proceso de gran importancia en mecanismos fundamentales para el funcionamiento de la célula, como la síntesis de proteínas, y tiene, además, multitud de aplicaciones tecnológicas: es uno de los métodos más baratos y rápidos de secuenciación molecular [1]; se puede utilizar para acortar proteínas [2], detectar micromoléculas de ADN [3] o, para determinar la distribución de masas de una mezcla de polímeros [4]. Por esta razón, desde la década de los 90 y hasta la actualidad, ha crecido el número de publicaciones sobre dicho fenómeno y la comunidad científica se ha lanzado a estudiarlo desde puntos de vista teóricos, experimentales y computacionales.

Durante los procesos de traslocación, un polímero pasa de un lado a otro de la membrana a través de un poro en la superficie de la misma. Las partes del polímero que no estén pasando a través del poro, se sitúan próximas a la pared, y, por tanto, van a presentar una interacción electrostática con la misma que afectará al proceso de traslocación.

En este trabajo se presentará un estudio de dicha interacción polímero-membrana desde un punto de vista teórico y computacional. Para ello se emplearán dos modelos de polímero (Freely-Jointed Chain Model y Worm-Like Chain Model) y se medirán diversas magnitudes que aportarán información acerca de la interacción polímero-membrana y de cómo afecta a la forma estructural del polímero. También se presentarán medidas de la interacción de los diversos monómeros del polímero con la membrana para comprobar qué monómeros interaccionan más durante la traslocación.

Todas estas medidas servirán para conocer más a fondo esta interacción, así como su papel en la traslocación, y aportarán una base para futuras simulaciones y estudios de dicha interacción con modelos de polímeros más sofisticados y realistas.

2. Principales modelos de polímeros: Freely-Jointed Chain Model y Worm-like Chain Model

2.1. Freely-Jointed Chain Model

Desde el inicio del estudio teórico de polímeros, a comienzos y mediados del siglo 20, se han propuesto diferentes modelos que pretenden explicar distintas características observadas en los polímeros reales. Dichos modelos fueron complicándose y refinándose a lo largo del siglo pasado con el objetivo de que cada vez fueran más fieles a la realidad y reprodujeran más comportamientos de las moléculas reales.

Uno de los primeros modelos propuestos para la modelización y el entendimiento teórico de los polímeros es el Freely-Jointed Chain Model, propuesto por Kuhn en la década

de 1930. En él, se considera al polímero como una sucesión de monómeros de una longitud determinada (b =longitud de Kuhn). Estos monómeros no son interactuantes entre sí y, se mueven de manera aleatoria por el medio debido a la agitación térmica.[5]

Se trata de un modelo poco realista, ya que no tiene en cuenta fenómenos de repulsión entre distintos monómeros. Sin embargo, el Freely-Jointed Chain Model, aunque sea simple, reproduce adecuadamente algunos fenómenos observados en los polímeros reales cuando se encuentran en disoluciones.

Un ejemplo de comportamiento que este modelo reproduce correctamente es la medida del radio de giro del polímero en función del tamaño del mismo (número de monómeros de la molécula).

El radio de giro de un polímero es una magnitud que mide cómo de separados están los monómeros del centro de masas de la molécula. Va a dar, por tanto, una idea del tamaño del polímero. Es una de las variables más importantes a la hora de estudiar la estructura de un polímero ya que va a proporcionar información sobre si el polímero está estirado, o, por el contrario, se encuentra muy plegado.

Se define de la siguiente manera:

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (R_i - R_{CM})^2 \quad (1)$$

siendo N el número de monómeros, R_i la posición del monómero i y R_{CM} la posición del centro de masas del polímero.

Un valor pequeño de esta magnitud va a implicar que los monómeros del polímero se encuentran cercanos al centro de masas de la molécula, y, por tanto, que el polímero se encuentra en una conformación globular. Por el contrario, un valor grande del radio de giro va a indicar gran separación entre los monómeros y el centro de masas, lo que indica que la molécula estará estirada.

Desarrollando el cuadrado, introduciendo la definición del centro de masas:

$$R_{CM} = \frac{1}{N} \sum_{j=0}^N R_j \quad (2)$$

y teniendo en cuenta que la correlación entre la posición de dos monómeros si estos son distintos es 0 y cuando se trata del mismo monómero es b^2 :

$$\langle R_i R_j \rangle = b^2 \delta_{ij} \quad (3)$$

se puede obtener, tras un breve cálculo la siguiente expresión del radio de giro para N grandes:

$$R_g \simeq \sqrt{\frac{Nb^2}{6}} \quad (4)$$

Otro de los fenómenos que este polímero va a explicar de manera satisfactoria es cómo se comporta la molécula cuando se aplica sobre sus dos extremos una fuerza. El polímero se irá alargando, pasando de una conformación globular a una conformación estirada conforme aumentemos la fuerza.

Si se aplica una fuerza F a un polímero, la energía por segmento va a ser la siguiente:

$$E_{segment} = -\vec{r}_i \cdot \vec{F} = -r_i F \cos(\theta) \quad (5)$$

La energía de toda la cadena será por tanto:

$$E_{chain} = -\sum_{i=1}^N \vec{r}_i \cdot \vec{F} \quad (6)$$

Se puede escribir la función de partición de la cadena como:

$$Z(N, F) = \sum_{estados} e^{-\frac{E}{k_B T}} = \sum_{estados} e^{\frac{1}{k_B T} \vec{F} \cdot \sum_{i=1}^N \vec{r}_i} = \int e^{\frac{1}{k_B T} \vec{F} \cdot \sum_{i=1}^N \vec{r}_i} \prod_{i=1}^N \sin(\theta_i) d\theta_i d\phi_i \quad (7)$$

Esta función de partición es factorizable, y, tras unos breves cálculos, se obtiene la siguiente expresión:

$$Z(N, F) = \left[\frac{4\pi \sinh\left(\frac{fb}{k_B T}\right)}{\frac{fb}{k_B T}} \right]^N \quad (8)$$

Una vez obtenida la función de partición factorizada va a ser sencillo calcular la energía libre del sistema. Diferenciándola respecto a la fuerza, se obtendrá la distancia extremo a extremo de la cadena Freely-Jointed Chain Model cuando se le aplique una fuerza externa constante.

$$G(F, N) = -k_B T \ln Z(N, F) = -k_B T N \left[\ln \left(4\pi \sinh \left(\frac{Fb}{k_B T} \right) \right) - \ln \left(\frac{Fb}{K_B T} \right) \right] \quad (9)$$

$$\langle L_z \rangle = -\frac{\partial G}{\partial F} = Nb \left(\coth \left(\frac{Fb}{k_B T} \right) - \frac{k_B}{Fb} \right) \quad (10)$$

La función obtenida es la función de Langevin, fórmula que aparece también en el estudio de los materiales paramagnéticos.

2.2. Modelo de simulación

Desde el punto de vista computacional, este modelo se puede simular de varias formas (malla de 1, 2 o 3 dimensiones...). En este trabajo se ha considerado el polímero como una sucesión de masas (los monómeros) unidas por muelles en un espacio tridimensional.

La dinámica de la cadena va a venir dada por la ecuación de Langevin sobreamortiguada:

$$m \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} + \gamma m \frac{d\vec{r}_i}{dt} = \sqrt{2m\gamma k_B T} \beta(t) - \vec{\nabla} V \quad (11)$$

donde se observa un término disipativo, lineal con la velocidad ($\gamma m d\vec{r}_i/dt$), un término estocástico (cuya variable estocástica es $\beta(t)$), y el gradiente del potencial del sistema, que variará en función del modelo de polímero y sistema que estemos considerando.

En el caso del modelo del FJC, este último término es el potencial elástico de los muelles que unen el polímero, es decir:

$$V_{FJC} = \frac{1}{2} k \sum_{i=1}^N (\|\vec{r}_i - \vec{r}_{i-1}\| - l_0)^2 \quad (12)$$

En cuanto al método de evolución temporal empleado para simular un polímero gobernado por esta ecuación, se ha utilizado el algoritmo de evolución estocástica de Gronbech-Jensen [6], cuyas fórmulas y funcionamiento se detallan en el apéndice B.

Con dichas herramientas y métodos de simulación se han obtenido los datos aquí presentados. En la figura 1, se representa ,a la izquierda, el radio de giro del polímero, y a la derecha, la distancia extremo a extremo de un polímero de 6 monómeros.

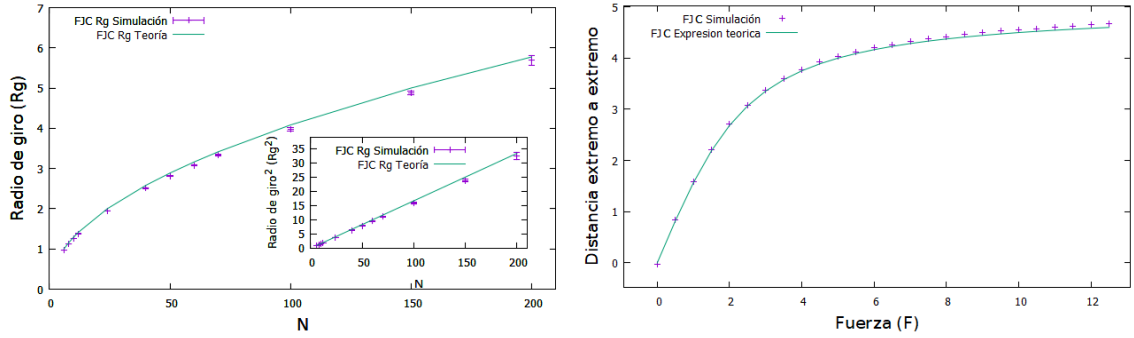


Figura 1: **Izquierda:** Gráfica grande: Radio de giro frente al tamaño del polímero. Valores teóricos (4) y de simulación. Modelo FJC. Gráfica pequeña: R_g^2 frente al tamaño del polímero para una mejor apreciación de la dependencia. Valores teóricos (4) y de simulación. FJC. **Derecha:** Distancia extremo a extremo del polímero frente a la fuerza aplicada. Valores teóricos (10) y de simulación. Modelo FJC.

Se comprueba que los datos obtenidos en la simulación y los obtenidos con las expresiones teóricas son adecuados y concuerdan, por lo que se puede concluir que la simulación propuesta en este trabajo reproduce satisfactoriamente el modelo de polímero Freely-Jointed Chain Model.

2.3. Worm-like Chain Model

Como ya se ha mencionado anteriormente en este documento, el Freely-Jointed Chain Model es un modelo poco refinado de polímero. Para describir ciertos comportamientos o para perfeccionar las predicciones teóricas ya obtenidas, se necesita tener en cuenta las interacciones entre los distintos monómeros de la molécula. Un modelo que tiene en cuenta estas interacciones es el Worm-like Chain Model (WLC). En él se introduce un potencial de rigidez a tres cuerpos consecutivos, definido por:

$$V_{B_i} = -B \cos \theta_i \quad (13)$$

En la expresión (13) la B es el parámetro del potencial WLC y determina la intensidad del mismo. El θ_i es el ángulo que forman los enlaces de los distintos monómeros entre sí. De acuerdo con la expresión del potencial (13), este alcanzará su valor mínimo cuando el ángulo entre los monómeros sea nulo, por tanto, va hacer que el polímero tienda a estar estirado.

Así, para el modelo WLC, el potencial que aparece en la ecuación de Langevin (11) vendrá dado por:

$$V_{WLC} = V_{FJM} + V_B = V_{FJM} + \sum_{i=0}^N V_{B_i} \quad (14)$$

Este modelo no dispone de una predicción teórica de la distancia extremo a extremo del polímero cuando se le aplican fuerzas en los extremos; pero, sí que proporciona una predicción del radio de giro del mismo [7].

Para el desarrollo teórico de la expresión del radio de giro en este modelo, es necesario introducir ciertas magnitudes. La primera es la longitud de correlación. Con esta variable se obtiene la relación que existe entre los vectores tangentes de distintos puntos del polímero, y que va a ser proporcional a la siguiente exponencial.

$$\langle \vec{l}(s) \vec{l}(s') \rangle \propto \langle \cos \theta(s) \rangle \propto e^{\frac{-|s-s'|}{L_p}} \quad (15)$$

La otra magnitud que hay que introducir es la longitud de persistencia. Aparece en el denominador del exponente de la expresión 15, y, por tanto, proporciona información sobre a qué distancia la longitud de correlación es nula. Se define en unidades de $k_B T$ de esta forma:

$$L_p = \frac{B}{k_B T} \quad (16)$$

donde B es el parámetro de potencial del WLC.

Una vez definidas estas variables se puede pasar ya calcular el radio de giro. Para el WLC, un modelo de polímero continuo, se puede escribir de la siguiente manera:

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{L} \int_0^L ds \int_s^L ds' \langle h^2(s' - s) \rangle \quad (17)$$

donde $\langle h^2(s' - s) \rangle$ es a distancia media entre dos puntos, s' y s . Dicha cantidad se va a poder calcular con la distancia media extremo a extremo del polímero para este modelo.

$$\langle h^2 \rangle = \int_0^L ds \int_0^L ds' \langle \vec{l}(s) \vec{l}(s') \rangle \quad (18)$$

Introduciendo la ecuación (17) y realizando la integral se puede obtener:

$$\langle h^2 \rangle = 2L_p^2 \left[\frac{L}{L_p} - 1 + e^{-\frac{L}{L_p}} \right] \quad (19)$$

Que a su vez introduciendola en la expresión (17) va a permitir llegar a la ecuación Benoit-Doty para el radio de giro del Worm-Like Chain Model.

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{L_p}{3L^2} \left[L^3 - 3L^2 L_p + 6L L_p^2 - 6L_p^3 \left(1 - \exp\left(-\frac{L}{L_p}\right) \right) \right] \quad (20)$$

cuyos límites para polímeros mucho menores o mucho mayores que la longitud de persistencia son, respectivamente:

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{12} L^2, L \ll L_p \quad (21)$$

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{3} L L_p, L \gg L_p \quad (22)$$

Estas expresiones, al igual que para el caso del Freely-Jointed Chain Model, se pueden comprobar con simulaciones.

Para un parámetro de potencial WLC $B=20$ se obtienen los datos teóricos (fórmula 20) y computacionales presentados en la figura 2.

Se observa que los datos teóricos y computacionales son compatibles entre sí.

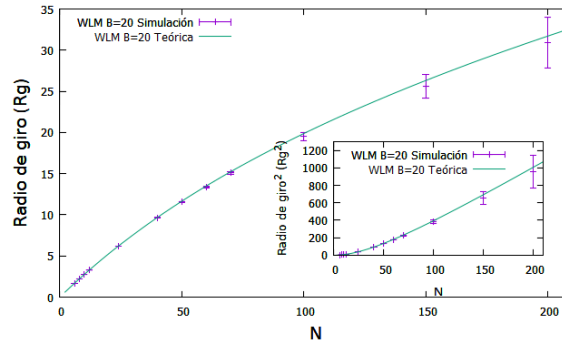


Figura 2: Radio de giro frente al tamaño del polímero. Modelo WLC. Valores teóricos (20) y experimentales. Figura pequeña: R_g^2 frente al tamaño del polímero. Valores teóricos (20) y experimentales.

Como ya ha sido mencionado, no existe una fórmula analítica para la distancia extremo a extremo del polímero frente a la fuerza aplicada. Sin embargo, sí que existe una expresión

de interpolación que permite predecir el comportamiento del polímero para fuerzas bajas y altas, pero no para el rango intermedio [7]. Esta fórmula fue propuesta por Marko y Siggia y es:

$$f = \frac{k_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1 - \langle h \rangle_f / L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{\langle h \rangle_f}{L} \right] \quad (23)$$

Los datos de la simulación para esta magnitud son los mostrados en la figura 3. En ella se ve que efectivamente para valores medios de fuerza, los valores computacionales se separan más de los proporcionados por la expresión (23), pero que para valores altos y bajos de fuerza el comportamiento se reproduce perfectamente.

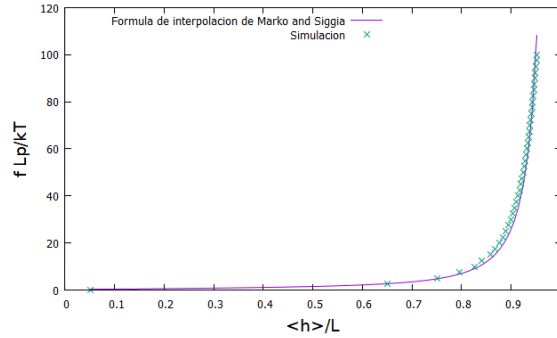


Figura 3: Fuerza frente a distancia extremo a extremo normalizada. Modelo WLC. Tamaño del polímero $N=70$. Valores teóricos (Fórmula de interpolación de Marko and Siggia (23)) y valores de la simulación.

3. Resultados analíticos de la interacción del polímero con la pared

Añadir una pared a nuestro sistema, va a hacer que todas las variables medidas cambien. Esto se debe a que, al introducir la pared en el sistema, el espacio de configuraciones posibles del polímero va a verse reducido. Esto hará que la función de partición del mismo varíe y que por tanto, su energía libre sea menor. Esta disminución en la energía libre va a hacer que todos los observables del polímero varíen con respecto al caso del polímero libre.

Del polímero con pared no existen tantos resultados analíticos como del caso del polímero libre, sin embargo, sí que se han obtenido algunas expresiones teóricas de la fuerza que ejerce la pared sobre el polímero en función del tamaño del mismo. Aquí se detalla el desarrollo necesario para obtener una expresión de analítica de esta magnitud. En el apéndice C se detalla un desarrollo para un sistema ligeramente distinto.

3.1. Fuerza polímero-pared para un sistema de malla con el polímero anclado a la pared

Para deducir la ecuación de la fuerza polímero-pared, en el eje perpendicular a la misma, en función del tamaño del polímero, se plantea un espacio de configuraciones de malla

tridimensional, en el cual los monómeros pueden tomar la posición de los nudos de la malla [8]. Se considera que la pared está situada en el plano $x = 0$.

Se supone que el polímero se encuentra anclado al punto $A = (0, 0, 0)$, el origen de nuestro sistema de referencia, y que no es posible que en la coordenada perpendicular a la pared (x), la posición de los monómeros sea negativa ($x_i \geq 0$). Para calcular la fuerza ejercida por el polímero sobre la pared, se calcula la función de partición de un sistema con estas características. Esta función de partición va a ser la suma de todas las configuraciones que permita la condición señalada en este párrafo, y se calculará como la suma de todas las configuraciones, menos las prohibidas.

Si se señala un punto al azar de los permitidos, al que llamaremos B . Se puede saber, por el principio de simetría, que todos los caminos no permitidos entre estos puntos van a tener solamente un camino simétrico¹ que vaya del punto $A' = (-2a, 0, 0)$ al punto B , donde es la constante de la malla ($a = 2L_p$), es decir, el espacio entre dos nodos de la malla.

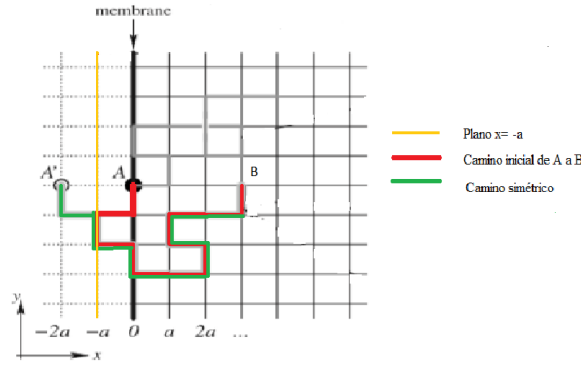


Figura 4: Ejemplificación de camino simétrico. Imagen modificada de la original de la referencia [8].

Que este camino simétrico sea único, va a hacer que todas los caminos prohibidos entre A y B se puedan escribir como todos los caminos posibles entre el punto A' y B . Como la función de partición será la suma de los caminos de A a un punto genérico (x_N, y_N, z_N) , menos los caminos no posibles entre estos dos puntos se puede escribir la siguiente fórmula. Teniendo en cuenta que los caminos prohibidos se pueden escribir como los caminos permitidos desde A' hasta el punto genérico anteriormente nombrado, se puede escribir:

$$\mathcal{Z} = \sum_{x_N \geq 0, y_N, z_N} \{ \mathcal{N}[A \rightarrow (x_N, y_N, z_N)] - \mathcal{N}[A' \rightarrow (x_N, y_N, z_N)] \} \quad (24)$$

Se va a poder desarrollar esta expresión como:

¹En este sistema se considera un camino simétrico respecto a otro a aquel que espeja el tramo del camino que va desde el punto A hasta el primer punto no permitido respecto al plano $x = -a$.

$$\begin{aligned}
\mathcal{Z} &= \sum_{x_N \geq 0, y_N, z_N} \{ \mathcal{N}[A \rightarrow (x_N, y_N, z_N)] - \mathcal{N}[A \rightarrow (x_N + 2a, y_N, z_N)] \} = \\
&= \sum_{x_N \in [0, a], y_N, z_N} \mathcal{N}[A \rightarrow (x_N, y_N, z_N)] = \\
&\approx (2d)^N \mathcal{P}(0 \leq x_N < 2a) \approx (2d)^N 2a \rho(0)
\end{aligned} \tag{25}$$

donde d es la dimensión del espacio, en este caso 3; $\mathcal{P}(0 \leq x_N < 2a)$ es la probabilidad de que una cadena acabe entre los puntos $x = 0$ y $x = 2a$; y $\rho(x)$ es la densidad de probabilidad de la posición de fin del polímero en el eje x , la cual viene dada por la siguiente expresión:

$$\rho(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{\frac{-x^2}{2\sigma^2}} \tag{26}$$

donde $\sigma^2 = a^2 N/d$. Entonces:

$$\rho(x=0) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \tag{27}$$

y por tanto la función de partición será:

$$\mathcal{Z} \approx \pi^{-1/2} (2d)^N \left(\frac{2d}{N} \right) \tag{28}$$

Una vez tenemos la función de partición, se va a calcular la energía libre como:

$$\phi = -k_B T \ln(\mathcal{Z}) \tag{29}$$

Sustituyendo 28 se obtiene:

$$\begin{aligned}
\phi &= -k_B T \ln \left[(2\pi)^N \left(\frac{2d}{N\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \right] = -k_B T N \ln(2d) - \frac{k_B T}{2} \ln \left[\frac{2d}{N\pi} \right] = \\
&= -k_B T N \ln(2d) - \frac{k_B T}{2} \ln \left[\frac{2d}{\pi} \right] - \frac{k_B T}{2} \ln \left[\frac{1}{N} \right]
\end{aligned} \tag{30}$$

Teniendo en cuenta que la fuerza va a venir dada por la derivada de la energía libre respecto a la longitud del polímero, y que la longitud del polímero es $L = aN$, se obtiene:

$$\mathcal{F} = -\frac{\partial \phi}{\partial L} = -\frac{1}{a} \frac{\partial \phi}{\partial N} \approx k_B T \frac{2d}{a} - \frac{k_B T}{2Na} \tag{31}$$

Si se introduce la equivalencia entre la longitud de persistencia y la constante de malla ($a = 2L_p$), se llega a :

$$\mathcal{F} = k_B T \frac{\ln(2d)}{2L_p} - \frac{1}{2} \frac{k_B T}{L} \tag{32}$$

4. Resultados experimentales de la interacción del polímero con la pared

Una vez se ha comprobado y estudiado el comportamiento del polímero aislado, así como el estudio teórico de este con la pared de la célula, se va a introducir la interacción polímero-pared en las simulaciones. La manera de introducir esta simulación va a ser añadir al polímero un potencial repulsivo. El potencial que se va a emplear para esto es una modificación del potencial de Lenard-Jones, y se define así:

$$V(z)_{pared} = \begin{cases} 4\epsilon \left(-\left(\frac{\sigma}{z}\right)^6 + \left(\frac{\sigma}{z}\right)^{12} \right) & \text{si } z < 2^{\frac{1}{6}}\sigma \\ 0 & \text{si } z > 2^{\frac{1}{6}}\sigma \end{cases} \quad (33)$$

donde los parámetros de la expresión indican la fuerza repulsora de la pared (ϵ), y la distancia a la que actúa (σ).

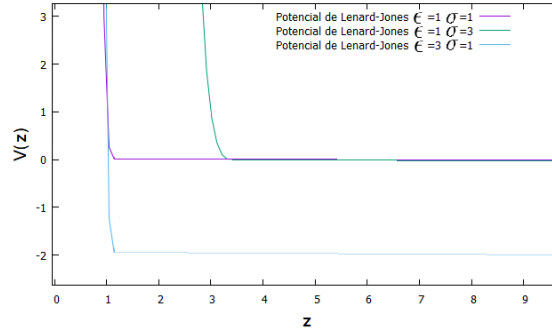


Figura 5: Potencial de Lenard-Jones modificado (33) para varios valores de ϵ y σ para visualizar su funcionamiento.

Sobre este sistema polímero-pared, se van a realizar medidas de varias magnitudes: radio de giro, distancia extremo a extremo, posición del centro de masas, fuerza entre la pared y el polímero... Para la medida de la fuerza entre la pared y el polímero, así como para evitar que la repulsividad de la pared aleje al polímero de esta y deje de interactuar, se une el primer monómero del polímero con la pared a través de un muelle.

Este muelle será sobre el que se realice la medida de la fuerza que provoca la pared en el polímero, y va a quedar definido por su longitud natural ($l_{0,pared}$) y por su constante elástica (k_{pared}). En todas las simulaciones realizadas para la obtención de los resultados de este documento, se han tomado los siguientes valores:

$$\begin{aligned} l_{0,pared} &= 0 \\ k_{pared} &= 0,1 \end{aligned} \quad (34)$$

El sistema global simulado será por tanto el mostrado en la figura 6.

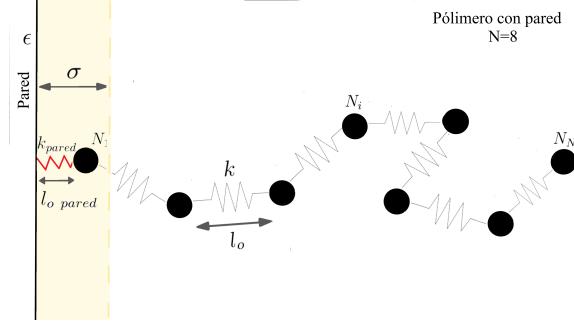


Figura 6: Esquema del sistema a simular con todas las variables del mismo.

Con todo esto, el potencial que tendremos que introducir en la ecuación de Langevin (11) para simular el sistema adecuadamente será:

En el caso del modelo FJC:

$$V_{FJC,pared} = V_{FJC} + V(z)_{pared} + V_{anclaje} \quad (35)$$

y para el modelo WLC:

$$V_{WLC,pared} = V_{WLC} + V(z)_{pared} + V_{anclaje} \quad (36)$$

donde $V_{anclaje}$ es el potencial asociado al muelle de anclaje del polímero a la pared, definido como:

$$V_{pared} = \frac{1}{2} k_{pared} (|\vec{r}_0| - l_{0,pared})^2 \quad (37)$$

Los datos obtenidos para las variables medidas en este sistema se presentan en el siguiente subapartado.

4.1. Freely-Jointed Chain Model

En primer lugar se presentan los datos de radio de giro, fuerza en la pared, distancia extremo a extremo y posición del centro de masas, estas últimas en el eje perpendicular a la pared.

De estos datos si que se tienen algunos resultados teóricos, por lo que será posible comprobar la veracidad de los mismos y ver si sería posible realizar alguna modificación a estos para que tengan una mayor concordancia con las simulaciones.

Se presentan a continuación los resultados que se han obtenido.

4.1.1. Fuerza en el eje perpendicular a la pared

Para esta magnitud se tiene la predicción teórica presentada en la ecuación (32). Sin embargo, el modelo de polímero presentado en este sistema no era exactamente igual al simulado en este trabajo, ya que en el estudio presentado en el apartado 3.1., el polímero

era una molécula que se movía en un espacio de configuraciones de malla mientras que en las simulaciones realizadas para obtener los datos aquí presentados, el entorno en el que se mueve el polímero no es una malla, si no un espacio en el que la molécula tiene libertad completa de movimiento.

Por este motivo, el fit para comprobar si este comportamiento se cumple, no se realizará exactamente a la ecuación (32), ya que en ella ciertos parámetros como la dimensión del espacio (d), no son completamente transportables a nuestra simulación. Por ello, el fit se realiza a la siguiente función:

$$f(x) = A + \frac{C}{2x} \quad (38)$$

El fit esperado para esta función no va a ser el más exacto, por las diferencias entre el modelo teórico y el simulado. Debido a esta razón, se ha realizado un fit a una segunda ecuación, muy similar a (38) pero con una modificación que hará que el fit sea mejor. Esta ecuación es:

$$g(x) = A' + \frac{C'}{2x^\gamma} \quad (39)$$

Los resultados obtenidos para ambos fits se muestran en la figura 7.

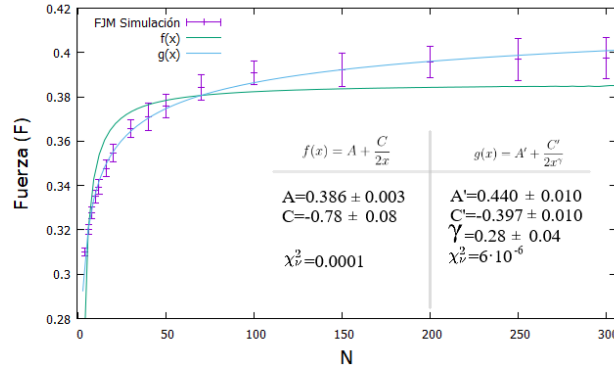


Figura 7: Datos de la fuerza polímero-membrana en el eje perpendicular a la pared para el FJC. Fits realizados a la función $A + C/x$ (38) (color verde) y a la función $A' + C'/x^\gamma$ (39) (color azul).

De acuerdo al método del χ^2_{red} ², ambos fits parecen correctos. Sin embargo, el fit realizado a la expresión (38) tiene un valor del χ^2_{red} mucho mayor, y reproduce de una manera muy poco adecuada el comportamiento de los datos obtenidos en la simulación. Esta discrepancia entre la teoría expuesta en el apartado 3.1. (fit azul) y los datos experimentales, puede deberse al hecho de que el sistema de configuraciones supuesto en el desarrollo teórico no es del todo compatible ni con la simulación ni con la realidad. En este desarrollo se supone que el espacio en el que se mueve el polímero es un espacio de malla y no uno con libertad total de movimiento para la molécula, que es el que se da en la simulación y en la realidad. Para adaptar el resultado teórico del apartado 3.1. (ecuación (32) a lo obtenido en las simulaciones y a un sistema más realista se propone añadir un exponente a la longitud del polímero (L), tal y como se hace en la expresión (39) (fit verde).

²El fit se considerará válido cuando el valor de χ^2_{red} sea menor o igual que uno $\chi^2_{red} \leq 1$

4.1.2. Radio de Giro

Aquí se presenta el radio de giro cuando el polímero interacciona con la pared, magnitud para la cual no se tiene predicción teórica. Para comprobar como cambia esta magnitud con respecto al caso sin pared, en la gráfica de los resultados, se ha representado la predicción teórica para el polímero libre, la cual viene dada por la expresión (4).

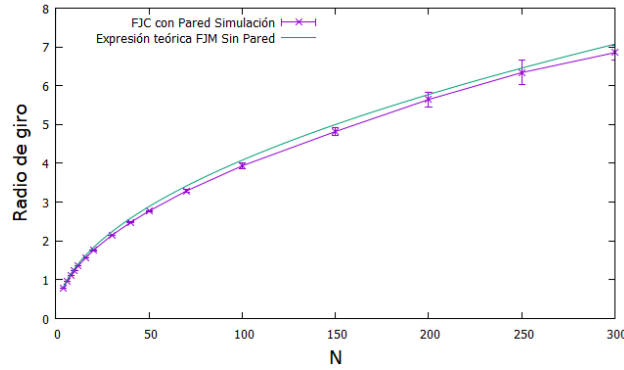


Figura 8: Radio de giro para el modelo FJC. Línea morada: Simulación con pared. Línea verde: Expresión teórica sin pared (4).

Se aprecia que el comportamiento es realmente similar, aunque ligeramente menor en el caso del polímero con pared. Esto querrá decir, que la acción de la pared va a compactar el polímero, aunque lo hará de forma muy leve.

4.1.3. Centro de masas y distancia extremo a extremo en el eje perpendicular a la pared

Se presentan los resultados obtenidos de estas dos magnitudes en la gráfica 9.

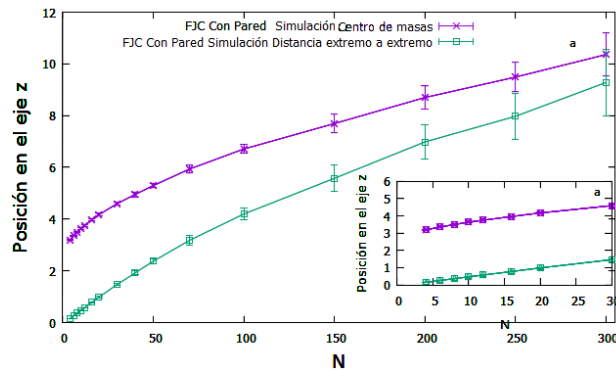


Figura 9: Gráfica grande: Centro de masas en el eje z (línea morada) y distancia extremo a extremo (línea verde) en el eje z. Modelo FJC. Gráfica pequeña: Comportamiento del centro de masas en el eje z (línea morada) y de la distancia extremo a extremo en el eje z (línea verde) para polímeros pequeños. Modelo FJC.

Se observa que el comportamiento de ambas magnitudes es considerablemente similar. Este hecho se aprecia especialmente para polímeros de pequeño tamaño en los cuales se ve que ambas gráficas presentan la misma dependencia. Para polímeros más grandes parece que las dos magnitudes se aproximan un poco.

Cabe destacar un fenómeno que en una primera reflexión parece antiintuitivo. El valor de la posición del centro de masas en el eje perpendicular a la pared es mayor que el valor de la posición extremo a extremo en ese mismo eje. Más adelante en este trabajo, y con el apoyo de las medidas de interacción con la pared de todos los monómeros de un polímero, se dará una posible explicación a este fenómeno.

4.2. Worm-like Chain Model

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las mismas medidas para el Worm-like Chain Model. Se han simulado diversos valores del potencial WLC (B), $B = 1$, $B = 2$, $B = 5$, $B = 10$, $B = 20$ y $B = 40$, para así poder comprender bien como dependen estas variables en función de dicho parámetro, y por tanto, de la longitud de persistencia (16).

En las gráficas, se ha representado también los datos obtenidos para el FJC, con lo que se visualizará aún mejor la variación de las magnitudes.

4.2.1. Fuerza en el eje perpendicular a la pared

Los datos obtenidos para la fuerza en el eje perpendicular a la pared para todas las simulaciones realizadas (FJC y WLC) son los presentados en la figura 10.

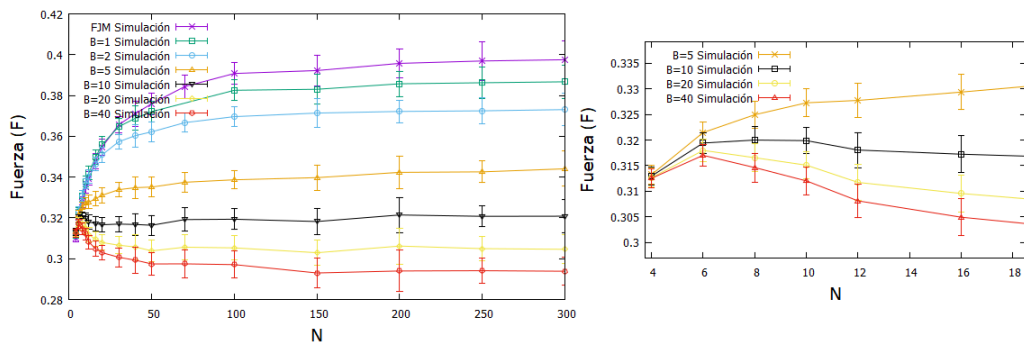


Figura 10: Izquierda: Fuerza en el eje perpendicular a la pared para el FJC y para el WLC con varios valores distintos del parámetro del potencial ($B = 1$, $B = 2$, $B = 5$, $B = 10$, $B = 20$, $B = 40$). Derecha: Zoom al comportamiento no monótono del WLC para polímeros pequeños.

Como se ve, hay una clara dependencia con respecto al potencial del WLC. Conforme se va aumentando el parámetro B , el valor de saturación de la fuerza en el eje perpendicular a la pared va disminuyendo. Se ha realizado un fit de los valores obtenidos de la fuerza

a las funciones exponencial y $C/x^\gamma + A$. Los resultados obtenidos del fit se presentan en el apéndice D.

Cabe destacar también que para el WLC con parámetro de potencial (B) grande, se observa un comportamiento no monótono cuando los polímeros son de pequeño tamaño (Figura 10, gráfica derecha). Para los parámetros de potencial $B = 10, 20$ y 40 , se observa que la fuerza tiene un pequeño máximo antes de alcanzar el estado de saturación en el cual es constante. Para comprender a que se debe este comportamiento, haría falta realizar estudios teóricos sobre la interacción polímero-membrana, no solo para el modelo FJC, si no también para el modelo WLC.

En la expresión obtenida en el apartado 3.1. (ecuación (32)), se puede ver que la fuerza de saturación para polímeros grandes ($L \rightarrow \infty$) es:

$$\mathcal{F}_{sat} = k_B T \frac{\ln(2d)}{2L_p} \quad (40)$$

Con los datos obtenidos en las simulaciones, se va a poder comprobar si los datos de las simulaciones se ajustan a la dependencia de la fuerza de saturación con respecto de la longitud de persistencia presentada en la ecuación (40). Para ello, realizaremos un fit de los valores de fuerza de saturación obtenidos a la siguiente función.

$$f(x) = \frac{D}{x^\gamma} \quad (41)$$

La gráfica y el fit que se obtienen se presentan en la figura 11.

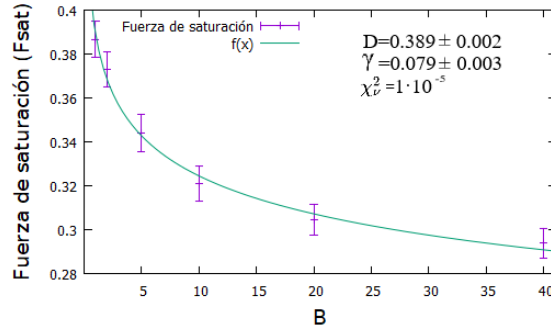


Figura 11: Fuerza de saturación en función del parámetro de potencial del WLC (B). Fit realizado a la expresión (41).

El factor χ^2_{red} es menor que uno, por lo que en un principio, se puede considerar como un fit adecuado.

Por otro lado, no se puede decir que los datos obtenidos en las simulaciones concuerden con la expresión teórica de la fuerza de saturación (40). Para que concordasen, el valor del exponente γ tendría que ser 1, y sin embargo el valor obtenido es $\gamma = 0,079 \pm 0,003$.

Al igual que ocurría con la fuerza en el eje perpendicular a la pared para el FJC, las predicciones teóricas del apartado 3.1. no se cumplen, y hace falta modificarlas para que concuerden con lo obtenido en las simulaciones.

4.2.2. Radio de Giro

En cuanto al radio de giro, se observa que conforme se va aumentando el parámetro de potencial del WLC (B) los radios de giros cada vez son mayores. Esto se debe a que cuanto mayor sea B , más rígido es el polímero, más estirado estará y, por tanto, mayor será su radio de giro.

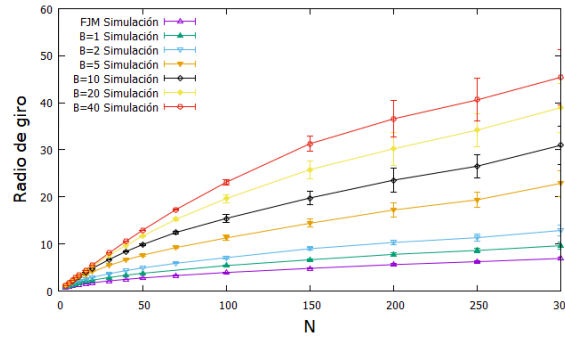


Figura 12: Radio de giro para el FJC y para el WLC con varios valores distintos del parámetro del potencial ($B = 1$, $B = 2$, $B = 5$, $B = 10$, $B = 40$).

4.2.3. Centro de masas y distancia extremo a extremo en el eje perpendicular a la pared

En cuanto a estas variables, sucede algo similar a lo que ocurre con el radio de giro. Conforme se aumenta B , los valores de ambas variables aumentan, debido al incremento en la rigidez del polímero.

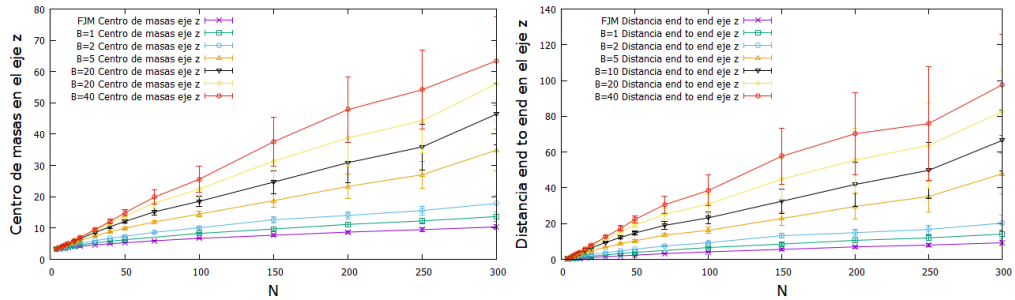


Figura 13: Izquierda: Centro de masas en el eje perpendicular a la pared en función del número de monómeros. Modelos FJC y WLC. Derecha: Distancia extremo a extremo en el eje perpendicular a la pared en función del número de monómeros. Modelos FJC y WLC.

4.3. Interacciones con la pared

Además de las medidas ya detalladas en los apartados anteriores, se han realizado también una serie de medidas para estudiar la interacción relativa que tienen los polímeros con la pared, y así ver que monómeros tienen un papel más relevante en la interacción. Con este objetivo se ha realizado, en primer lugar, una medida del número de interacciones de cada monómero con la pared. Se entiende como interacción, la entrada de un monómero en la zona en la que actúa el potencial de la pared (33). Por tanto, si un monómero pasa a estar a una distancia menor de $2^{1/6}\sigma$ de la pared en la coordenada z , se considera que ha interactuado con la misma. El número de interacciones obtenido para un polímero FJC de $N = 20$ se presenta en la figura 14.

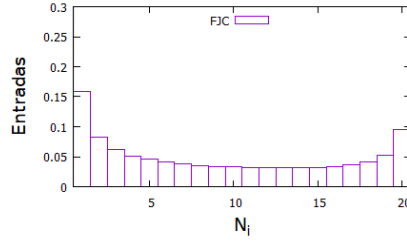


Figura 14: Número de entradas de cada monómero en la región de acción de la pared normalizadas con el número total de entradas de todos los monómeros en dicha región. Modelo FJC $N = 20$.

Para el caso de un polímero WLC de $N = 20$, para distintos valores del potencial WLC (B), se han obtenido los valores presentados en la figura 15.

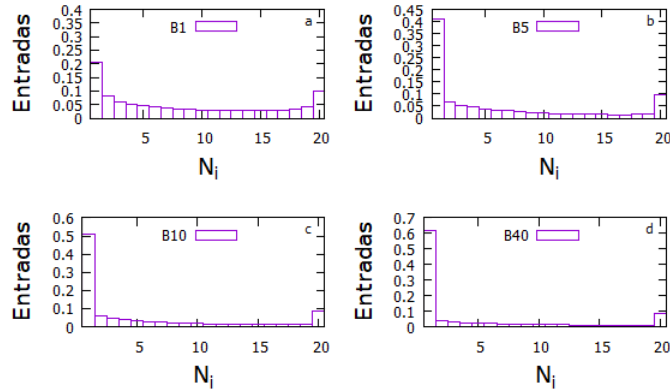


Figura 15: Número de entradas de cada monómero en la región de acción de la pared normalizadas con el número total de entradas de todos los monómeros. Modelo WLC $N = 20$. Gráfica a: $B = 1$. Gráfica b: $B = 5$. Gráfica c: $B = 10$. Gráfica d: $B = 40$.

También se han realizado gráficas del tiempo de interacción de los monómeros con la pared. Para ello se han registrado los pasos de tiempo que los monómeros pasan en la región de acción del potencial de la pared (33) en vez de el número de veces que entran en la misma.

Los datos obtenidos para los polímeros de 20 monómeros del FJC y el WLC se presentan en las figuras 16 y 17 respectivamente.

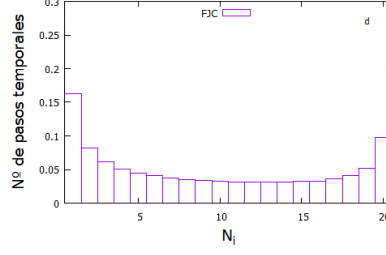


Figura 16: Tiempo de interacción total (número de pasos temporales) de cada monómero con la pared normalizado con el tiempo total de interacción de todos los monómeros. Modelo FJC $N = 20$.

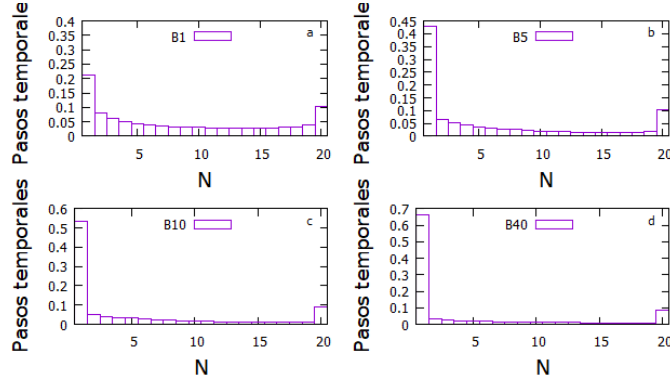


Figura 17: Número de pasos temporales de interacción con de cada monómero con la pared normalizado con el número de pasos totales de interacción de todos los monómeros. Modelo WLC $N = 20$. Gráfica a, $B = 1$. Gráfica b, $B = 5$. Gráfica c, $B = 10$. Gráfica d, $B = 40$.

Se ve, en primer lugar, que las gráficas de interacciones y de tiempo son muy similares dos a dos (FJC con FJC, WLC de $B = 1$ con WLC de $B = 1$...), por lo que se puede concluir que el tiempo que pasa cada monómero en contacto con la pared por interacción es el mismo, sea el monómero que sea.

En cuanto a la forma funcional de estas gráficas, cabe destacar que en todas se aprecia que el monómero más interactuante es el primero. A partir de este monómero, el número de entradas o el tiempo de interacción van disminuyendo poco a poco. La primera partícula, al estar unida a la pared por el muelle, va a ser la más interactuante. Los monómeros posteriores a este primero, tendrán más probabilidad de interactuar con la pared cuanto más cercanos sean a este primer polímero anclado a la pared.

Por otra parte, también se observa que conforme se aumenta el valor del parámetro del potencial del WLC Model (B), el primer monómero sufre más interacciones y la caída en el número de interacciones del primero al segundo monómero es más abrupta. Esto se debe

a la rigidez del polímero WLC. Cuanto más rígido sea el polímero (mayor sea el valor de B), mayor será la tendencia del mismo a estirarse, y por tanto, menos probable será que los monómeros que no sean el primero interactúen con la pared.

Sin embargo, también se observa un comportamiento inesperado. Conforme se llega al final de la molécula, el número de entradas y el tiempo de interacción vuelven a aumentar, especialmente en el último monómero, para el cual se observa, en todas las simulaciones realizadas, un número significativo de interacciones.

Para intentar dar una explicación a este fenómeno, se va a calcular la distancia media de las partículas a la pared en el eje perpendicular a la misma, así como la varianza de esta magnitud. Esta varianza va a dar la anchura de la distribución de posiciones de las partículas en este eje. Así, y de acuerdo con los datos obtenidos en las figuras 14, 15, 16, 17; cabría esperar que las partículas más interactuantes (las primeras y las últimas), tuvieran una anchura de distribución que se adentrara en la región de acción de la pared, o por lo menos, que estuviera más cerca de hacerlo, ya que eso indicaría que su movimiento favorece la interacción.

Se presenta, a continuación, una representación esquemática del fenómeno esperado para su mejor visualización.

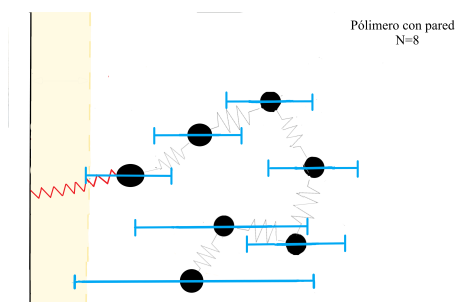


Figura 18: Representación esquemática de la diferencia de anchura de las distribuciones del movimiento de los monómeros en el eje z . La barra azul representa la distribución de la posición promedio z de cada monómero.

Esto indicaría que efectivamente, es más probable que los primeros y los últimos monómeros entren en la zona de interacción. Los primeros al estar unidos por el muelle de anclaje (rojo), y los últimos debido a su mayor anchura de distribución de posiciones. Se presentan los datos obtenidos de distancia promedio y de varianza para el modelo FJC en la siguiente figura:

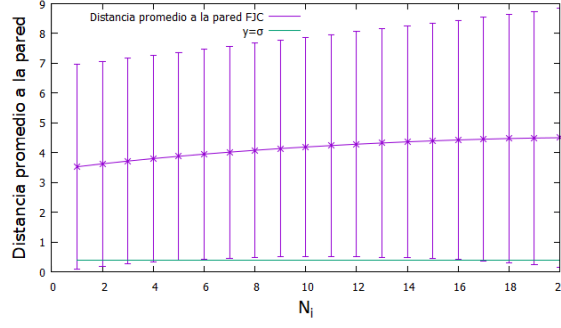


Figura 19: Distancia promedio a la pared en el eje perpendicular a ella. Las barras verticales indican la raíz de la varianza de cada uno de los monómeros. La línea verde representa el rango de acción e la pared. FJC $N = 20$.

En la parte inferior de la figura se aprecia claramente el fenómeno que se esperaba y que concuerda con las medidas presentadas hasta ahora. Las distribuciones de los primeros monómeros, debido su menor distancia promedio en este eje, y la de los últimos monómeros, debido a su mayor anchura, se adentran más en la región de acción de la pared que las de las partículas intermedias del polímero.

Una posible explicación para el hecho de que las partículas del final del polímero tengan una mayor anchura de distribución y que interaccionen más con la pared es la baja k_{pared} que tiene el sistema simulado (34). Esta baja k_{pared} va a hacer que el polímero tenga un anclaje débil, y que por tanto, tenga una mayor libertad de movimiento. Esta libertad, le permitirá realizar desplazamientos muy amplios en los cuales podrá llegar incluso a rotar 180° haciendo que su extremo se encuentre más cerca de la pared que su monómero inicial. Esta idea del débil anclaje queda reforzada por el elevado valor obtenido de la posición promedio en el eje perpendicular a la pared. Para un muelle con $l_{0,pared} = 0$ anclado al punto $z = 0$, y un sistema con una pared de potencial, cabría esperar que la posición de la partícula unida a dicho muelle fuera cercana a la frontera de acción de la pared. Sin embargo, en nuestro sistema se observa que la frontera de acción de la pared $z = 0,44$ (33) y posición promedio del monómero anclado a la misma se encuentran alejadas.

Esta puede ser también la razón de que la distancia extremo a extremo de un polímero FJC en el eje perpendicular a la pared sea menor que la posición de su centro de masas en ese mismo eje (apartado 4.1.3.). Los movimientos explicados en el párrafo anterior, son los que van a permitir que este fenómeno se produzca, ya que van a hacer que la distancia extremo a extremo del polímero se reduzca.

Estos movimientos de giro permitidos por el débil anclaje, van a ser más difíciles para el modelo WLC, ya que el polímero será más rígido, y un giro de 180° será más complicado debido a las propias restricciones del potencial WLC. Esto se ve más claramente en la siguiente gráfica:

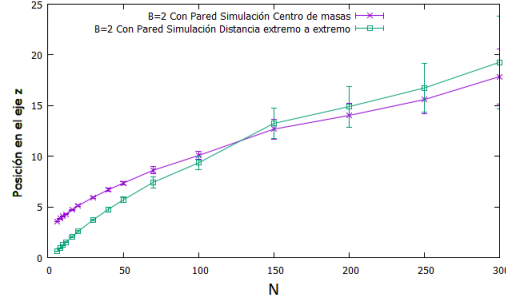


Figura 20: Centro de masas en el eje z (línea morada) y distancia extremo a extremo (línea verde) en el eje z . Se aprecia el cruce de ambas magnitudes en torno a $N = 125$

En ella se muestra la posición del centro de masas en el eje perpendicular a la pared y la distancia extremo a extremo en ese mismo eje para un polímero WLC con $B = 2$. Se ve que para tamaños pequeños del polímero, este todavía tiene cierta libertad de movimiento y se va a poder girar. Sin embargo, conforme se va aumentando el tamaño del polímero, el giro va a ser más difícil, ya que habrá más partículas que se tengan que girar, y será más fácil que alguna se vea repelida por la pared. Esto hará que para cierta longitud, la distancia extremo a extremo se haga mayor, tal y como se ve en la figura 20. En el apéndice E se adjuntan las mismas gráficas para distintos parámetros de potencial (B).

Por último, se ha medido la posición media que tienen los monómeros cuando interactúan con la membrana. Los distancias obtenidas se presentan en las figuras (21) y (22):

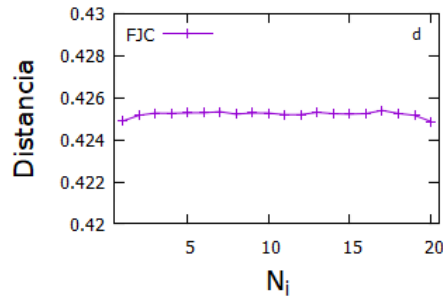


Figura 21: Distancia a la que se encuentran los monómeros de la pared cuando se encuentran interactuando con ella. Modelo FJC $N = 20$.

Se observa que la partícula inicial y final tienen interacciones más fuertes que el resto, lo cual podría tener sentido ya que son las partículas menos unidas al polímero y que, por tanto, más se van a poder adentrar en la región de acción de la pared. También se observa que las interacciones de las partículas centrales del polímero, son más débiles conforme se aumenta la B , esto se debe a que va a ser más difícil que las partículas centrales del polímero se adentren en la pared cuanto más rígida sea la molécula.

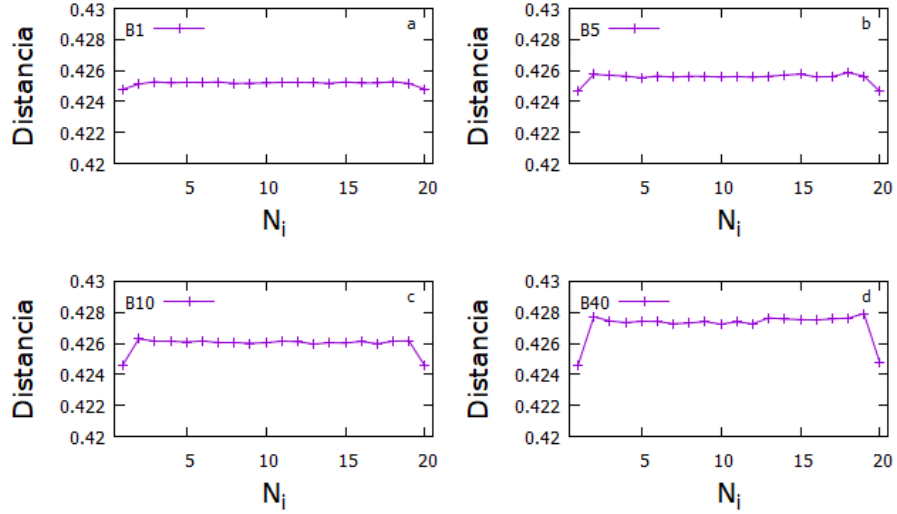


Figura 22: Distancia a la que se encuentran los monómeros de la pared cuando se encuentran interactuando con ella. Modelo WLC $N = 20$. Gráfica a: $B = 1$. Gráfica b: $B = 5$. Gráfica c: $B = 10$. Gráfica d: $B = 40$.

5. Discusión final y conclusiones

La interacción polímero-pared, objeto principal de estudio en este trabajo, es una interacción relevante en la dinámica molecular de los polímeros debido a su papel fundamental en la traslocación. Durante la totalidad de este proceso, el polímero va a encontrarse interactuando no solo con el poro por el que cruza la membrana, sino también con toda la pared que rodea al mismo. Por esta razón, si se quieren entender en profundidad y detalle los procesos de traslocación que se dan en la célula, se ha de entender también la interacción polímero-pared que se produce durante la misma. La pared, debido a su acción repulsora y a su papel como limitador del espacio de configuraciones posibles del polímero, va a modificar el movimiento y el comportamiento de la molécula, tal y como se ha visto en la sección 3 de este trabajo.

Una de las magnitudes más relevantes de la interacción polímero-pared es la fuerza en el eje perpendicular a la membrana, estudiada en este trabajo. Esta fuerza, dificulta el proceso de traslocación en la zona cis, mientras lo favorece en la zona trans, de ahí la importancia de conocer y estudiar su comportamiento.

Las principales conclusiones del estudio realizado son las siguientes:

- La expresión teórica presentada en el apartado 3.1. (32), no se ajusta adecuadamente a las simulaciones realizadas en este trabajo, y es necesaria una modificación de la expresión teórica para lograr una reproducción fiel de los resultados obtenidos (39).
- En el modelo WLC, para parámetros de potencial (B) altos, aparece un comportamiento no monótono en las gráficas de fuerza en el eje perpendicular a la membrana

para polímeros de pequeño tamaño. Este comportamiento no se observa en el FJC ni tampoco en el WLC para B bajos. (sección 4.2.1).

- En el estudio de la importancia individual de cada monómero en la interacción con la pared (Sección 4.3) se observa que las partículas finales del polímero tienen un papel no despreciable en dicha interacción. Se observa que las partículas iniciales y finales son las que más interacciones tienen, mientras que las partículas centrales del polímero tienen un número de interacciones mucho menor (Figuras 14, 15, 16, 17). Además, estos monómeros de los extremos son los que sufren interacciones más fuertes (Figura 22).
- Se observa la importancia del valor de la constante elástica del muelle de anclaje (k_{pared}) en la interacción. Fijar un valor bajo de k_{pared} permite que se den movimientos de rotación más amplios y que se puedan observar fenómenos *a priori* antiintuitivos como que la distancia extremo a extremo en el eje perpendicular a la membrana sea menor que el centro de masas del polímero en ese mismo eje (Figuras 9 y 20).

Todos estos nuevos fenómenos abren puertas a multitud de estudios posteriores, tanto teóricos, como computacionales:

- Estudios teóricos como el presentado en el apartado 3.1., pero sobre un espacio de configuraciones más realista, tal vez consigan obtener una expresión teórica que se ajuste mejor a los datos de las simulaciones, y aplicándolos al modelo WLC quizás se obtenga también el comportamiento no monótono observado ya en los experimentos computacionales.
- Por otro lado, un estudio más detallado de la interacción de las últimas partículas de los monómeros, y de si este se produce también para valores de k_{pared} más elevados podrá ayudar a entender si estas partículas juegan un papel tan relevante en la traslocación como el que parece que juegan en la interacción polímero-pared.

La totalidad de las simulaciones se han realizado empleando código propio desarrollado en el lenguaje C, y sin la utilización de paquetes ya programados. Se adjunta el código empleado en el apéndice G.

Bibliografía

- [1] KASIANOWICZ, J. , BRANDIN, E. , BRANTON, D. y DEAMER, D. (1996). *Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel*. PNAS 24, 13770-13773. Recuperado de <https://www.pnas.org/content/93/24/13770>
- [2] GU, L. , WANUNU. , MCGRATH, J. y FAUCHET, P. (2007). *Charge- and size-based separation of macromolecules using ultrathin silicon membranes*. Nature 445, 749–753. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/nature05532>
- [3] GU, L. Q., WANUNU, M., WANG, M. X., MCREYNOLDS, L., y WANG, Y. (2012). *Detection of miRNAs with a nanopore single-molecule counter*. *Expert review of molecular diagnostics*, 12(6), 573-584.
- [4] ROBERTSON, J. W., RODRIGUES, C. G., STANFORD, V. M., RUBINSON, K. A., KRASILNIKOV, O. V., y KASIANOWICZ, J. J. (2007). *Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), 8207-8211.
- [5] POLYMER PROPERTIES DATABASE (2015). <https://polymerdatabase.com/polymer%20physics/Kuhn.html>
- [6] GRONBECH-JENSEN, N., HAYRE, N. R., FARAGO, O. (2014). *Application of the G-JF discrete-time thermostat for fast and accurate molecular simulations* Computer Physics Communications 185, 524-527.
- [7] VAN DER MAAREL J.R.C. (2008). *Introduction to Biopolymer Physics* Singapore: World Scientific.
- [8] FARKAS, Z., DERÉNYI, I. y VICSEK, T. (2003). *DNA uptake into nuclei: numerical and analytical results* J. Phys.: Condens. Matter 15, S1767-S1777.
- [9] ROWGHANIAN, P. y GROSBERG, A. Y. (2011). *Force-Driven Polymer Translocation through a Nanopore: An old Problem Revised* j. Phys. Chem. B 115, 14127-14135.